

GLASILO HRVATSKOG FARMACEUTSKOG DRUŠTVA

GOD. XLXI

SVIBANJ 1993.

BROJ 5

FAGLAI

Farm.Glas.

ISSN 014-8202

ZNANSTVENI RADOVI*Danica Kuštrak i Željko Maleš (Zagreb)***Izolacija flavonoida iz listova velike zlatnice
– *Solidago gigantea* Ait.**

(Primljeno 24. 02. 1993.)

Isolation of flavonoids from leaves of Solidago gigantea Ait.

S u m m a r y – Six flavonoids were isolated from the ethyl acetate extract of the leaves of *Solidago gigantea* Ait. by means of silicagel column chromatography and preparative chromatography. Four isolated flavonoids were identified as quercetin, quercitrin, isoquercitrin and rutin (thin-layer chromatography, UV spectrophotometry).

(Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb)

UVOD

Zlatnica, *Solidago virgaurea* L. (Asteraceae) već je tisućljećima cijenjena kao ljekovita biljka. Spominju je već bilinari čuvenih liječnika. Prvi podaci o njevoj terapijskoj uporabi potječu iz 13. stoljeća. U bilinarima srednjeg vijeka, a osobito u 16. stoljeću, zlatnica se pojavila kao vrlo ljekovita droga (1).

Ona nije oficijalna u europskim farmakopejama, izuzev europske i američke homeopatske farmakopeje. U današnjoj fitofarmaciji ova je ljekovita droga sastavna komponenta brojnih fitopreparata. Budući da se ona ne javlja u velikom broju primjeraka na svojim prirodnim staništima, događa se da se na tržištu ljekovitih droga pojavljuje patvorena velikom zlatnicom, *Solidago gigantea* Ait.

Velika zlatnica, *S. gigantea* također pripada porodici Asteraceae. To je biljka, sa 1 do 2 m visokom i uspravnom, golom stabljikom. Listovi su zašiljeno-lancetasti, naizmjenični i dugi oko 10 do 15 cm. Cvjetne glavice su malene, 5 do 6 mm duge i cilindrične, sakupljene u sastavljene cvatove u obliku metlice. Cvjetovi su zlatnožute boje, a jezičasti cvjetovi znatno nadvisuju ovoj. Vrijeme cvatnje je od kolovoza do rujna (2,3).

Velika zlatnica, je podrijetlom iz Sjeverne Amerike, a u Europu je donesena kao ukrasna biljka. Nalazi se u nasadima parkova, kao i u vrtovima. Negdje je

pobjegla u slobodnu prirodu, pa se susreće uz riječne obale, puteve te na nasipima (4). Uz veliku zlatnicu iz Sjeverne Amerike je donešena i kanadska zlatnica, *S. canadensis*, koja se također jako raširila.

Nedostatak prave zlatnice, a pojava velikog broja preparata, stavila je znanstvenike pred zadatak da se detaljnije pozabave kemizmom velike zlatnice, kako bi ju se moglo priznati paralelnom drogom, a ne patvorinom.

Od kemijskih tvari nazočnih u velikoj zlatnici detaljno su ispitivani furanski diterpenoidi (5), a posebno saponini (6–8). Prema Schilcheru (9) velika zlatnica sadrži sljedeće flavonoide: kvercitrin, izokvercitrin, rutin, astragalin i nikotiflorin. Poljski autori (10) su ispitivali flavonoide u inflorescencijama četiriju vrsta roda *Solidago* i identificirali 53 flavonoida, koji su predstavljeni sa 27 struktura. Uz derivate kvercetina, kemferola i izoramnetina dokazali su i nazočnost derivata diletina, koji se javljaju samo u vrstama *S. virgaurea* i *S. gigantea*.

To je bio razlog da i mi pridemo identifikaciji, odnosno izolaciji flavonoida iz listova velike zlatnice, *S. gigantea*.

EKSPERIMENTALNI DIO

Biljni materijal

Materijal za ispitivanje bio je uzorak listova velike zlatnice – *S. gigantea*, sakupljen u kolovozu 1990. godine na obroncima Bilogore (Miholjanec, Virje). Priprema konačnog ekstrakta prikazana je u shemi 1.

1. Kromatografija na tankom sloju etilacetatnog ekstrakta s obzirom na nazočnost flavonoida

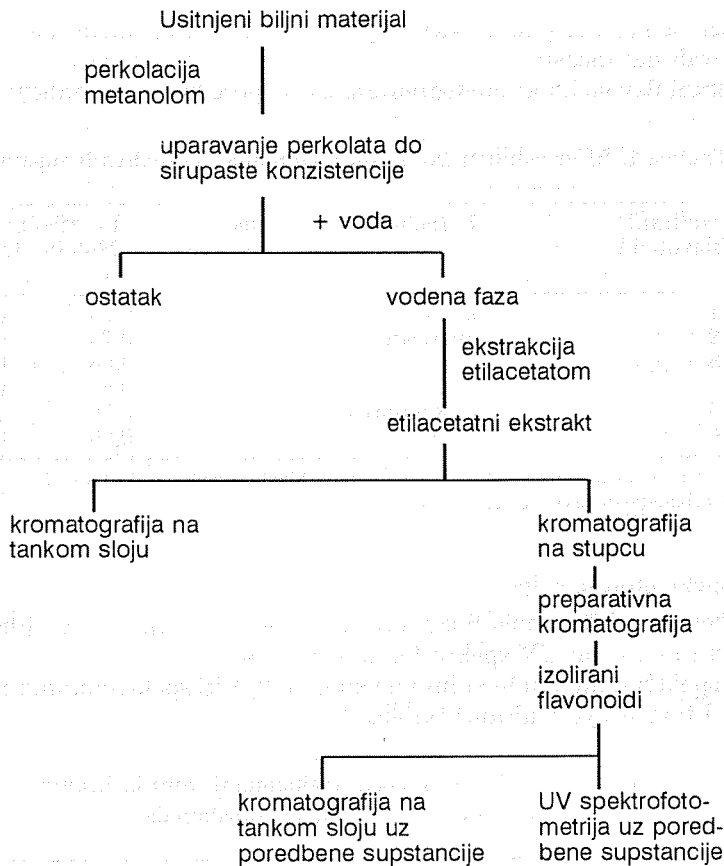
Etilacetatni ekstrakt listova velike zlatnice kromatografiran je na tankom sloju silikagela G prema Stahlu. Kao mobilne faze primijenjene su sljedeće smjese otapala:

- a) etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27) (11)
- b) etilacetat-mravlja kiselina-voda (88:6:6) (12)
- c) etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1) (13)

Nakon razvijanja kromatogrami su prskani NST-reagensom (1%-tnom metanolnom otopinom β -etilaminoestera difenil-boratne kiseline), a nakon toga s PEG-om (5%-tnom etanolnom otopinom polietilenglikola 4000) (11). Kromatogrami su promatrani u UV svjetlu kod 365 nm i uočeno je 5–6 narančastih mrlja, kao i jedna blještavoplava fluorescencija.

2. Izolacija flavonoida

Etilacetatni ekstrakt pomiješan je sa silikagelom za kromatografiju na stupcu (veličina zrna 0.063–0.200 mm) te je oblikovan prašak, koji je nanesen na prethodno priređen stupac. Za odjeljivanje pojedinih komponenata primijenjena je smjesa otapala etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1).



Shema 1.

Sakupljene frakcije kontrolirane su metodom kromatografije na tankom sloju s obzirom na nazočnost odijeljenih komponenata. Frakcije su sadržavale po nekoliko komponenata, pa je daljnje odjeljivanje provedeno preparativnom kromatografijom na tankom sloju uz istu mobilnu fazu.

Izolirano je šest flavonoida te jedna supstanција s plavom fluorescencijom.

3. Identifikacija izoliranih flavonoida

a) Kromatografija na tankom sloju

Izolirani flavonoidi identificirani su metodom kromatografije na tankom sloju na gotovim pločama Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Upotrijebljene su dvije mo-

bilne faze, a kao reagens za detekciju NST/PEG. Flavonoidi su u UV₃₆₅ n fluorescirali narančasto.

Izolirani flavonoidi kromatografirani su uz poredbene supstancije (tablica 1)

Tablica 1. R_f vrijednosti izoliranih flavonoida i poredbenih supstancija

Izolirani flavonoid	Poredbena supstancija	R _f vrijednosti Mobilne faze	
		I	II
1	kvercetin	0,96	0,91
2	kvercitrin	0,75	0,71
3		0,66	0,63
4		0,65	0,56
5	isokvercitrin	0,59	0,53
6	rutin	0,50	0,24

I etilacetat-mravlja kiselina-ledena octena kiselina-voda (100:11:11:27)

II etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1)

b) UV-spektrofotometrija

Flavonoid 1 i flavonoid 6 izolirani su u većoj količini, pa je njihov identitet potvrđen i metodom UV-spektrofotometrije (14).

UV spektri u metanolu snimljeni su na UV/VIS spektrofotometru SP 8–1 (proizvod tvrtke Pye Unicam) (tablica 2).

Tablica 2. UV apsorpcijski maksimumi (nm) izoliranih flavonoida i poredbenih supstancija

Flavonoid 1	255,	269sh,	295sh,	370
Kvercetin*	255,	269sh,	301sh,	370
Flavonoid 6	257,	266sh,	299sh,	357
Rutin*	259,	266sh,	299sh,	359

* poredbena supstancija

RASPRAVA REZULTATA

Nakon uklanjanja organskog otapala iz perkolata, ostatak je razmuljen vodi. Vodena faza je zatim izmuckana etilacetatom, budući je ovo organsko otapalo najprikladnije za ekstrakciju flavonoida (shema 1). Preliminarno ispitivanje nazočnosti flavonoida u priređenom ekstraktu provedeno je metodom kromatografije na tankom sloju u tri mobilne faze. Najveći broj dobro odijeljeni mrlja postigli smo upotrebom mobilne faze etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1). Za detekciju je upotrijebljen vrlo osjetljiv NST/PEG reagens. Promjena

trajanjem kromatograma u UV₃₆₅ nm zapaženo je 5–6 narančastih mrlja, kao i jedna mrlja blještavoplave fluorescencije.

Nakon toga uslijedila je izolacija flavonoida kromatografijom na stupcu uz mobilnu fazu etilacetat-mravlja kiselina-voda (8:1:1). Budući da su frakcije sadržavale po nekoliko komponenata, daljnje odjeljivanje nastavljeno je preparativnom kromatografijom na tankom sloju uz istu mobilnu fazu.

Identitet izoliranih flavonoida 1–6 potvrđen je kromatografijom na tankom sloju uz poredbene supstancije u dvije mobilne faze. Rezultat ovog ispitivanja potvrdio je nazočnost kvercetrina (flavonoid 1), kvercitrina (flavonoid 2), izokvercitrina (flavonoid 5), te rutina (flavonoid 6). Druga dva flavonoida, označena kao flavonoid 3 i flavonoid 4, nismo uspjeli identificirati, jer su izolirani u vrlo malim količinama, a po R_f vrijednostima i narančastoj fluorescenciji pretpostavljamo da se radi o derivatima kvercetrina (tablica 1).

Supstancija s blještavoplavom fluorescencijom također je izolirana, a na osnovu literaturnih podataka (11) pretpostavljamo da se radi o klorogenskoj kiselini, koja je čest pratilac flavonoidnih spojeva.

Kako su kvercetin (flavonoid 1) i rutin (flavonoid 6) izolirani u većim količinama, njihov identitet potvrđen je i metodom UV spektrofotometrije. Snimljeni su spektri izoliranih flavonoida i poredbenih supstancija u metanolu (tablica 2). Izolirani kvercetin imao je maksimume apsorpcije kod 255 i 370 nm, a izolirani rutin kod 257 i 357 nm. Maksimumi apsorpcije izoliranog kvercetrina i kvercetrina-poredbene supstancije bili su identični, dok su se apsorpcijski maksimumi izoliranog rutina i rutina-poredbene supstancije razlikovali za samo 2 nm.

(Zavod za farmaceutsku botaniku i farmakognoziiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu).

Literatura – References

- (1) D. Kuštrak, R. Apostoloski, Farm. Glas. **45**, 101 (1989).
- (2) R. Domac, Mala flora Hrvatske i susjednih područja, Školska knjiga, Zagreb, 1989, s. 383.
- (3) O. Polunin, Pflanzen Europas, BLV Verlagsgesellschaft, München-Bern-Wien, 1977, s. 85.
- (4) H. G. Menssen, Phytotherapeutische Welt, Verlags-GmbH, Frankfurt/Main, 1983, s. 128.
- (5) Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Vierte Neuauflage, VI Band, Chemikalien und Drogen, Teil B.R.S., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1979, s. 452.
- (6) K. Hiller, C. Hein, P. Franke, Pharmazie, **38**, 73 (1983).
- (7) K. Hiller, H. Bardella, H. R. Schulten, *ibid.* **42**, 622 (1987).
- (8) G. Reznicek, J. Jurenitsch, W. Kubelka, G. Michl, E. Haslinger, Sci Pharm. **57**, 206 (1989).
- (9) H. Schilcher, Dtsch. Apoth.-Ztg. **105**, 681 (1965).
- (10) J. Budzianowski, L. Skrzypczak, M. Wesolowska, Sci. Pharm. **58**, 15 (1990).
- (11) H. Wagner, S. Bladt, E. M. Zgainski, Drogenanalyse, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1983, s. 163.
- (12) M. Wichtl, Teedrogen, Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1989, s. 396.
- (13) M. Luckner, O. Bessler, R. Luckner, Pharmazie **20**, 681 (1965).
- (14) T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1970, s. 126.